

Ispitivanje inhibicije kolagenaze i antioksidativne aktivnosti odabranih biljnih vrsta

Vujnović, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:392756>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marina Vujnović

**Ispitivanje inhibicije kolagenaze i antioksidativne
aktivnosti odabranih biljnih vrsta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na susretljivosti, korisnim i stručnim savjetima i prilici za rad u laboratoriju. Posebno hvala mojim roditeljima bez kojih bi sve ovo bilo nemoguće.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Olea europaea</i>	2
1.2. <i>Medicago sativa</i>	3
1.3. <i>Medicago lupulina</i>	4
1.4. <i>Achillea millefolium</i>	5
1.5. <i>Plantago lanceolata</i>	6
1.6. <i>Plantago major</i>	7
1.7. <i>Centaurea jacea</i>	8
1.8. Oksidativni stres	9
1.9. Starenje kože	10
1.10. Kolagenaza	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali za ispitivanje	14
3.1.1. Biljni materijal	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Uređaji	14
3.2. Priprema ekstrakata	15
3.3. Metode ispitivanja	16
3.3.1. β -karoten linoleatna analiza	16
3.3.2. Ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala	16
3.3.3. Analiza inhibicije enzima kolagenaze	17
3.3.4. Statistička obrada	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. β -karoten linoleatna analiza	19
4.2. Ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala	21
4.3. Analiza inhibicije enzima kolagenaze	23
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	28
7. SAŽETAK / SUMMARY	32
7.1. Sažetak	33
7.2. Summary	34
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	35

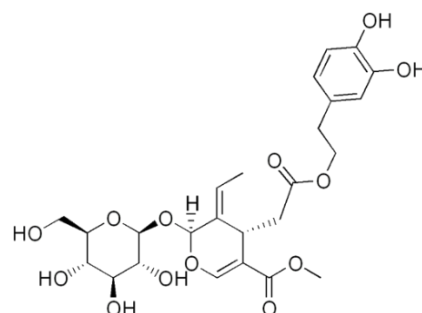
1.UVOD

1.1. *Olea europaea*

Maslina (*Olea europaea* L., Oleaceae, Slika 1.) je dugoživuće zimzeleno drvo visoko 8-12 m rasprostranjeno u priobalnom pojasu Sredozemnog mora i ne podnosi niske temperature. Ima razgranatu krošnju s bijelim cvjetovima koji se nalaze u grozdastim cvatovima i izbijaju obično u travnju. Plodovi masline su zelene, ovalne koštunice, dužine 2-3 cm od kojih se izrađuje maslinovo ulje. Listovi su tamnozeleni, nasuprotni, kožasti, lancetasti i savijeni prema naličju koje je srebrnasto i dlakavo. Ima gorak i trpak okus, bez mirisa (Kuštrak, 2005).



Slika 1. Maslina (*Olea europaea* L., Oleaceae) (Thomé, 1885)



Slika 2. Struktura oleuropeina (<https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein>)

Drogu čine osušeni listovi. Maslina sadrži sekoiridoide oleuropein (Slika 2.), 11-demetileuropein i 7,11-dimetil derivat (oleozid). Djelovanje se pripisuje oleuropeinu kojeg ima i u maslinovom ulju i daje mu gorak okus. Sadrži i flavonoide i triterpene. Oleuropein je spazmolitik, antioksidans, snižava krvni tlak pa se koristi kao antihipertenziv te kao diuretik. U narodnoj medicini se koristi kao antipiretik i kao antidijabetik jer smanjuje koncentraciju glukoze u krvi (Zovko Končić, 2014; Marković, 2005; <http://www.theplantlist.org/>).

1.2. *Medicago sativa*

Lucerna (*Medicago sativa* L., Fabaceae, Slika 3.) je višegodišnja zeljasta biljka uspravne i razgranate stabljike visine do 1 m. Korijen je dobro razvijen i dubok oko 6 m. Listovi su naizmjenični, trodijelni s izduženim jajolikim i nazubljenim liskama, a na vrhu svake liske se nalazi bodljica. Na osnovi peteljke nalaze se mali i ušiljeni palistići. Cvjetovi se nalaze na kratkim stapkama i skupljeni su u duguljaste grozdaste cvatove. Vrijeme cvatnje je od lipnja do rujna. Plod je spiralno savijena mahuna sa sitnim, žutosmeđim sjemenkama. Lucerna se lako prilagođava na različite klimatske uvjete pa se može naći od vrlo hladnih područja u planinama sve do Mediterana. Nalazimo ju na livadama i uz putove (Grlić, 1990; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 3. Lucerna (*Medicago sativa* L., Fabaceae) (<https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa>)

Sadrži alkaloidne, aminokiseline, karoten, kumarine, flavonoide, minerale, vitamine, fitoestrogene, saponine i veliku količinu celuloze. Studije su pokazale da konzumacija lucerne dovodi do sniženja kolesterola i smanjuje nakupljanje aterosklerotskog plaka. Lucerna ima i antioksidativno djelovanje, a pokazala je i učinkovito djelovanje kod menopauzalnih tegoba. Također sadrži i neproteinsku aminokiselinu L-kanavanin koja zbog sličnosti s argininom i natjecanja za vezanje na vezno mjesto arginina u enzimima i proteinima može dovesti do toksičnih učinaka i pojave simptoma sličnih sistemskom lupusu (Bora i Sharma, 2011).

1.3. *Medicago lupulina*

Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae, Slika 4.) ima razgranatu, 10-60 cm dugu i dlakavu stabljiku. Listovi su sastavljeni od tri listića koji su sa donje strane dlakavi. Cvatovi su sastavljeni od 10-50 sitnih žutih cvjetića. Plod hmeljaste vije su sitne crne mahune, 2-3 mm duge. Raste po livadama i poljima, uz puteve većinom na hranjivom tlu bogatom dušikom (Grlić, 1990; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 4. Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae)

(https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina)

U hmeljastoj viji pronađena su četiri flavonoida i identificirana kao laricitrin i njegova tri glikozida (kempferol, kvercetin i miricetin). Sadrži i alkaloidne, fenole, saponine, tanine i diterpene. Hmeljasta vija ima antibakterijsku, antifungalnu i antitumorsku aktivnost. Najbolju antibakterijsku aktivnost pokazala je za *Staphylococcus aureus*, a antifungalnu za *Candida albicans*. Istraživanja su pokazala da ima i antioksidativni potencijal (Kicel i Olszewska, 2014; Baloch i sur., 2013; Burda i Jurzysta, 1988).

1.4. *Achillea millefolium*

Stolisnik (*Achillea millefolium* L., Asteraceae, Slika 5.) je višegodišnja biljka, stabljike duge do 80 cm. Stabljika je zelena i okrugla te se pri vrhu grana. Listovi su dugi i višestruko perasto rascijepljeni, nazubljenog ruba. Prizemni listovi imaju peteljku, a gornji obuhvaćaju stabljiku i naizmjenično su izrasli. Mlađi listovi su dlakaviji od starijih. Glavice bijelih jezičastih cvjetova skupljene su u gustom cvatu i nalaze se na kratkoj peteljci. Vrijeme cvatnje je od lipnja do rujna. Aromatičnog je mirisa i gorko slanog okusa (Kuštrak, 2005; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 5. Stolisnik (*Achillea millefolium* L., Asteraceae) (Thomé, 1885)

Raste po livadama, pašnjacima, poljima i vrtovima od nizina do gorskog pojasa Europe, Azije, Sjeverne Amerike i Australije. Drogu čine osušeni vrškovi stolisnika u cvatu. Stolisnik sadrži 0,2-1% eteričnog ulja, seskviterpenski lakton proazulen, flavonoide (7-O-glikozid apigenina i luteolina), C-glikozilflavone, fenolkarboksilne kiseline i kumarine. Također ima visok sadržaj gorkih tvari pa se koristi kao sredstvo za poboljšanje apetita. Stolisnik djeluje protuupalno, antimikrobno, antifungalno te kao adstringens, spazmolitik i diuretik. Najčešće se koristi kod dispeptičkih tegoba i grčeva u gastrointestinalnom traktu te za cijeljenje rana (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

1.5. *Plantago lanceolata*

Uskolisni trputac (*Plantago lanceolata* L., Plantaginaceae, Slika 6.) je trajnica i ima stabljiku dugu od 5 cm do 30 cm. Listovi su uski, lancetasti, šiljasti, dužine 10-20 cm složeni u prizemnu rozetu. Na vrhu stabljike nalazi se smeđi klasasti cvat dužine 2-3 cm. Rasprostranjen je po cijeloj Europi, sjevernoj i srednjoj Aziji i raste po suhim livadama, uz putove, nasipe i u planinskim područjima. Drogu čine osušeni, maslinastoželeni ili smeđi listovi, stabljika i cvat. Listovi ne smiju biti tamnosmeđi jer to upućuje na kemijske promjene sastavnica odgovornih za terapijski učinak. Listovi se sabiru za vrijeme cvatnje, od svibnja do listopada, kad su potpuno razvijeni (Kuštrak, 2005; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 6. Uskolisni trputac (*Plantago lanceolata* L., Plantaginaceae) (https://hr.wikipedia.org/wiki/Uskolisni_trputac)

Uskolisni trputac sadrži oko 6,5 % polisaharidnih hidrokoloida i to ramnogalakturonan, arabinogalaktan i glukomanan. Sadrži i iridoidne glikozide (aukubin, katalpol i asperulozid), trijeslovine, fenolkarboksilne kiseline, kumarin eskuletin i flavonoide apigenin, luteolin i skutelarein. Uskolisni trputac ima antimikrobno i protuupalno djelovanje. U fitoterapiji koristi se za smirivanje podražaja na kašalj pri kataru dišnih putova, upali sluznice usne šupljine i ždrijela. Zbog velike količine kalija djeluje i kao diuretik. Također se koristi za zacjeljivanje rana, za njegu oštećene i upaljene kože (Kuštrak, 2005; Toplak Galle, 2001).

1.6. *Plantago major*

Veliki trputac (*Plantago major* L., Plantaginaceae, Slika 7.) ima višegodišnju stabljiku visine 10-40 cm sa širokim jajolikim ili eliptičnim listovima. Plojka ima 3-7 paralelnih žila, cjelovitog je ruba i približno je 1,5 puta duža nego što je široka. Listovi se sužavaju u peteljku koja je iste dužine kao i plojka i oblikuju prizemnu rozetu. Od lipnja do rujna se razvijaju cvjetovi u obliku valjkastog klasa. Drogu čini zelen koja se sabire za vrijeme cvatnje. Stanište mu je uz puteve, na padinama i na neobrađenom zemljištu (Kremer, 007; Kuštrak, 2005; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 7. Veliki trputac (*Plantago major* L., Plantaginaceae) (Thomé, 1885)

Za terapijski učinak odgovorne su iste kemijske sastavnice kao i vrste *P. lanceolata*, a to su oko 6,5 % polisaharidnih hidrokoloida i to ramnogalakturonan, arabinogalaktan i glukomanan, iridoidni glikozidi (aukubin, katalpol i asperulozid), trijeslovine, fenolkarboksilne kiseline, kumarin eskuletin i flavonoidi apigenin, luteolin i skutelarein. Veliki trputac se koristi za razrijeđenje sluzi i ublažavanje nadražaja kod katara gornjih dišnih putova, kod upala sluznica probavnog sustava i za zacjeljivanje rana (Kremer, 2007; Kuštrak, 2005; Ašič, 1995).

1.7. *Centaurea jacea*

Livadna zečina (*Centaurea jacea* L., Asteraceae, Slika 8.) je višegodišnja zeljasta biljka, uspravne stabljike koja može biti gola ili prekrivena dlačicama, jednostavna ili razgranata, a raste u visinu do 80 cm. Listovi su lancetasti i dlakavi i izgledom se razlikuju pri vrhu i dnu stabljike. Prizemni listovi su na dugim peteljka dok su listovi pri vrhu sjedeći i cjelovitog ruba. Ljubičasti cvjetovi, jajastog oblika, veličine 1-2 cm, skupljeni su u pojedinačne glavice koje se nalaze na vrhu stabljike. Cvate od srpnja do listopada. Plod je ahenij dug oko 3 mm, gol ili prekriven dlačicama, sjajan i blijedosivi do svijetlosmeđi. Rasprostranjena je u Europi i Aziji na livadama, šumskim čistinama i uz puteve nizinskih i brdskih područja (Lakušić i Mišić, 1990; <http://www.theplantlist.org/>).



Slika 8. Livadna zečina (*Centaurea jacea* L., Asteraceae) (Thomé, 1885)

Livadna zečina je bogata flavonoidima (centaureidin, centaurein, jaceidin i jacein). Izolirani su i cirsiliol, apigenin, hispidulin, cnicin i izokempferid. Ima jako inhibitorno djelovanje na proliferaciju tumorskih stanica koje se pripisuje flavonima i seskviterpenima. Kao najaktivnija sastavnica se pokazao centaureidin. U narodnoj medicini koristi se kod povišene tjelesne temperature i u dermatologiji (Forgo i sur., 2012; Rosler i sur., 1971).

1.8. Oksidativni stres

Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa pri čemu prevladavaju prooksidansi. Budući da je to normalna posljedica biokemijskih procesa u tijelu u normalnim okolnostima razina slobodnih radikala je kontrolirana raznim enzimskim (superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza) i neenzimskim sustavima (bilirubin, α -tokoferol, albumin, β -karoten, itd.). Do poremećaja homeostaze češće dolazi zbog povećanog stvaranja slobodnih radikala nego zbog smanjene antioksidativne zaštite organizma. Uslijed povišene razine slobodnih radikala dolazi do oštećenja DNK, proteina i lipida stanične membrane. Slobodni radikali su reaktivni atomi ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Njihovom interakcijom s nekom drugom molekulom ponovno se stvaraju slobodni radikali i dolazi do lančane reakcije koja dovodi do oštećenja stanica. Oksidativni stres nije nužno samo štetna pojava jer stvaranje slobodnih radikala na mjestu upale potiče uništenje patogena, a sudjeluju i u raznim kataboličkim i anaboličkim procesima te u stvaranju ATP-a. Do povećane proizvodnje slobodnih radikala može doći tijekom endogenih procesa i tijekom izlaganja okolišnim čimbenicima kao što su UV zrake, pušenje i zagađeni okoliš. Uključeni su u proces starenja, razvoj karcinoma, astme, kardiovaskularnih oboljenja, neurodegenerativnih i drugih bolesti (Liguori i sur., 2018; Rahal i sur., 2014; Halliwell, 2007).

Protiv oksidativnog oštećenja, kojeg uzrokuju slobodni radikali, organizam se štiti brojnim molekulama koje nazivamo antioksidansi. Antioksidansi su većinom enzimi, ali mogu biti i male molekule. Oni djeluju kao hvatači radikala te ih na taj način neutraliziraju i gase. Mogu se nalaziti u stanici ili izvan nje. Premda organizam endogenim mehanizmima najčešće uspijeva održavati homeostazu, pravilnom prehranom unose se brojni egzogeni antioksidansi poput vitamina C, vitamina E, fenolnih kiselina, flavonoida i drugih malih molekula koji pomažu u borbi protiv oksidativnog stresa. Upravo zato je pozornost usmjerena na razvoj i izolaciju prirodnih antioksidansa iz biljnih izvora. Prirodni antioksidansi mogu biti fenolni spojevi (flavonoidi, fenolne kiseline i tanini), spojevi s dušikom (alkaloidi, aminokiseline, peptidi, amini), karotenoidi, tokoferoli, askorbinska kiselina i drugi (Liguori i sur., 2018; Amarowicz i sur., 2004).

1.9. Starenje kože

Starenje kože je kompleksna pojava kontrolirana intrinzičnim i ekstrinzičnim faktorima koji uzrokuju progresivni gubitak strukture i funkcije kože. Intrinzično starenje se definira kao prirodno starenje kože i manifestira se kao stanjena, opuštena koža s tankim borama. Ekstrinzični faktori kao što je UV zračenje, pušenje i zagađeni okoliš dovode do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNA stvarajući slobodne radikale. Oni reagiraju s enzimima (kolagenaza, elastaza, tirozinaza i ksantin oksidaza) i uslijed toga može doći do progresivnog gubitka funkcije kože i preuranjenog starenja (gubitak elasticiteta, duboke bore, gruba i hrapava koža). Dugotrajna izloženost kože UV zrakama uzrokuje stvaranje eritema, nastanak bora, hiperpigmentacija, melanoma i smanjenu sposobnost zacjeljivanja rana (Zhang i Duan, 2018; Biswajit i sur., 2017).

Biljni polifenoli i flavonoidi mogu apsorbirati UV zračenje i kao takvi imaju potencijal za upotrebu u razvoju novih formulacija u preparatima za zaštitu od sunca. Biljni spojevi se dugo istražuju kao prirodni antioksidansi i inhibitori enzima povezanih sa hiperpigmentacijama, upalama i drugim kožnim oboljenjima. Zbog toga imaju veliki potencijal u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u prevenciji preranog starenja kože (Biswajit i sur., 2017).

1.10. Kolagenaza

Kolagen je glavna sastavnica vezivnog tkiva, kose i noktiju. Odgovoran je za elastičnost, snagu i fleksibilnost kože, a proizvode ga fibroblasti. Tkiva bogata kolagenom su primarno pogođena fotostarenjem što rezultira u vidljivim promjenama na koži poput bora, pigmentacija i promjena u debljini. Reaktivne kisikove vrste potiču ekspresiju proteinaza koje su odgovorne za remodeliranje ekstracelularnog matriksa poput matriksnih metaloproteinaza (MMP) i serin proteaze. MMP su dio grupe transmembranskih cink endopeptidaza gdje spadaju i kolagenaze. Kolagenaze su MMP koje cijepaju ostale molekule prisutne u stanici. Kolagenaza cijepa X-Gly vezu kolagena i peptida koji sadržavaju redoslijed -Pro-X-Gly-Pro, gdje X označava bilo koju aminokiselinu (Thring i sur., 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Od davnina je poznata upotreba biljnih ekstrakata u topikalnim pripravcima za njegu kože. Linoleinska kiselina je esencijalna masna kiselina i kao takva ima važnu ulogu u očuvanju zdravlja kože, no pod negativnim vanjskim utjecajima poput onečišćenja, pušenja i UV zračenja stvaraju se slobodni radikali. Slobodni radikali u odsustvu prirodnih antioksidansa, koji ih neutraliziraju, mogu uzrokovati oštećenja stanica i posljedično dovesti do starenja kože. Kolagen je strukturni protein kože, njegova vlakna su vrlo čvrsta, odupiru se istezanju, ali se lako savijaju te tako daju koži fleksibilnost i čvrstoću. Kolagenaze su proteolitički enzimi koji razgrađuju kolagen pa bi njihova inhibicija pridonijela očuvanju elastičnosti kože.

Ovim radom ispitani su ekstrakti biljnih vrsta *Olea europaea*, *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* i *Centaurea jacea*. Za analizu su korišteni etanolni ekstrakti biljnih droga različitih koncentracija kako bi se usporedio utjecaj otapala na ekstrakciju. Cilj rada bilo je ispitivanje antioksidativne aktivnosti pomoću ORAC i β -karoten linoleatne metode te ispitivanje sposobnosti inhibicije kolagenaze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali za ispitivanje

3.1.1. Biljni materijal

Ispitivani su listovi biljne vrste *Olea europaea* i zeleni biljnih vrsta *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* i *Centaurea jacea*.

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije: β -karoten, Tween 40, tert-butil-4-hidroksianisol (BHA), 2,2-Azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (AAPH), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), kolagenaza (Sigma Aldrich, USA); linoleinska kiselina (TCI, Japan); limunska kiselina, DMSO (Kemika, Zagreb); galna kiselina (MP Biomedicinal Inc., SAD); etanol (Gram mol d.o.o., Zagreb); diklormetan (Lach-ner, Češka); metanol (VWR chemicals, SAD); želatina (Torlak, Beograd); kalcij klorid (Merck, Njemačka); fluorescein (Carlo Erba reagents); 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Acros Organics); natrijev citrat; cinkov klorid; ninhidrin reagens; PEG 4000; TRIS-HCl; kositrov klorid dihidrat; natrijev hidroksid i klorovodična kiselina.

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala; precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska); inkubator (INKO, Zagreb); ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), rotavapor (Büchi, Njemačka) i spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

3.2. Priprema ekstrakata

Ekstrakti biljnih vrsta *O. europaea*, *M. sativa*, *M. lupulina*, *A. millefolium*, *P. lanceolata*, *P. major* i *C. jacea* pripremljeni su otapanjem 3 g usitnjene biljne droge u 30 mL otapala u Erlenmeyerovoj tikvici (10 %; 50 %; 90 % etanola). U Tablici 1. nalaze se biljne vrste, porodica, hrvatski naziv biljke i njihova oznaka u ispitivanju. Tikvice su inkubirane u ultrazvučnoj kupelji 20 minuta pri 25 °C. Sadržaj je profiltriran u tikvice s okruglim dnom. Zatim su tikvice uparavane pri 45 °C pa skladištene u eksikator preko noći, a sljedeći dan je sadržaj pohranjen u viala. Za ispitivanje β-karotena pripremljene su otopine ekstrakata otapanjem biljne droge u 10 % DMSO-a. Za ispitivanje kolagenaze pripremljene su otopine ekstrakata otapanjem biljne droge u 5 % DMSO-a. Po potrebi je zbog otežanog otapanja primijenjen ultrazvuk. Svi ekstrakti su nakon pripreme pohranjeni u zamrzivaču.

Tablica 1. Biljne vrste korištene u ispitivanju.

Oznaka u ispitivanju*	Biljna vrsta	Porodica	Hrvatski naziv
OE10; OE50; OE90	<i>Olea europaea</i>	Oleaceae	Maslina
MS10; MS50, MS90	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	Lucerna
ML10; ML50; ML90	<i>Medicago lupulina</i>	Fabaceae	Hmeljasta vija
AM10; AM50; AM90	<i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	Stolisnik
PL10; PL50; PL90	<i>Plantago lanceolata</i>	Plantaginaceae	Uskolisni trputac
PM10; PM50; PM90	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	Veliki trputac
CJ10; CJ50; CJ90	<i>Centaurea jacea</i>	Asteraceae	Livadna zečina

* Broj u nazivu se odnosi na volumni udio etanola korištenog za ekstrakciju: 10%, 50% i 90%

3.3. Metode ispitivanja

3.3.1. β -karoten linoleatna analiza

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu po Amarowiczu i sur. U tikvici s okruglim dnom otopljeni su β -karoten i Tween 40 u diklormetanu. Otapalo je uklonjeno pomoću rotavapora u hladnoj kupelji te je dodana linoleinska kiselina i aerirana destilirana voda u manjim obrocima uz snažno miješanje. U jažice 50 μ L ekstrakta dodano je 200 μ L emulzije. Kao pozitivna kontrola korištena je metanolna otopina BHA, dok je za negativnu kontrolu korišteno 50 μ L otapala. Odmah po dodatku emulzije izmjerena je apsorbancija uzoraka na 459 nm ($t = 0$). Smjesa je inkubirana na 45 $^{\circ}$ C, a apsorbancija je mjerena svakih 5 minuta tijekom jednog sata do kraja ispitivanja ($t = 60$).

Antioksidativna aktivnost (ANT) izračunata je kao postotak inhibicije brzine izbjeljivanja β -karotena u odnosu na kontrolu prema jednadžbi (1):

$$ANT (\%) = \frac{R_{kontrola} - R_{uzorak}}{R_{kontrola}} \times 100 \quad (1)$$

gdje su $R_{kontrola}$ i R_{uzorak} prosječna brzina izbjeljivanja β -karotena u emulziji bez antioksidansa (negativna kontrola) i s biljnim ekstraktom (Amarowicz i sur., 2004).

3.3.2. Ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu po Gillespieu i sur. (2007). U jažice mikrotitarske ploče otpipetirano je 25 μ L fosfatnog pufera (pH 7,0), standarda Trolox-a različitih koncentracija ili otopine ekstrakta. Zatim je dodano 150 μ L otopine fluoresceina i inkubirano 10 minuta pri 37 $^{\circ}$ C. Nakon inkubacije je dodano 25 μ L otopine AAPH te je izmjerena fluorescencija pri 37 $^{\circ}$ C svakih 150 sekundi tijekom 60 minuta na ekscitacijskoj i emisijskoj valnoj duljini od 485 nm, odnosno 528 nm. Učinak je izračunat oduzimanjem površine ispod krivulje slijepe probe od površine ispod krivulje uzorka. Aktivnost je izražena u Trolox ekvivalentima korištenjem krivulje standarda (TE) (Gillespie i sur., 2007).

3.3.3. Analiza inhibicije enzima kolagenaze

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu prema radu Zhanga i sur. (2013). U jažice mikrotitarske ploče otpipetirano je 40 μL inhibitora/uzorka te 20 μL otopine kolagenaze. Ploča je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi, a nakon inkubacije otpipetirano je 30 μL otopine želatine te inkubirano 15 minuta pri 37 $^{\circ}\text{C}$. Nakon druge inkubacije otpipetirano je 40 μL quench buffera koji je pripremljen otapanjem EDTA i PEG-a 4000 u destiliranoj vodi. Zatim je pripremljen ninhidrin reagens miješanjem otopina ninhidrina i $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, otopljenih u DMSO-u, u jednakim omjerima. Dodano je 90 μL ninhidrin reagensa u jažice te je ploča inkubirana u vodenoj kupelji na 75 $^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije ploča se hladi na sobnoj temperaturi 20 minuta, a nakon hlađenja je otpipetirano 90 μL citratnog pufera pH=5. Reakcijski pufer je pripremljen otapanjem Tris-HCl (50 mM) u destiliranoj vodi te se podesi pH na 7,5 s 1 M NaOH ili 1M HCl, zatim je dodano CaCl_2 (5 mM) i ZnCl_2 (1 μM) i nadopunjeno do 100 mL destiliranom vodom. Apsorbancija izmjerena na valnoj duljini od 545 nm. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina galne kiseline, a kao negativna reakcijski pufer i DMSO (Zhang i sur., 2013).

3.3.4. Statistička obrada

Sva ispitivanja provedena su u triplikatu. Kao mjera aktivnosti korištena je koncentracija ekstrakta koja izaziva 50% inhibicije oksidacije, odnosno enzima kolagenaze (IC_{50}). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

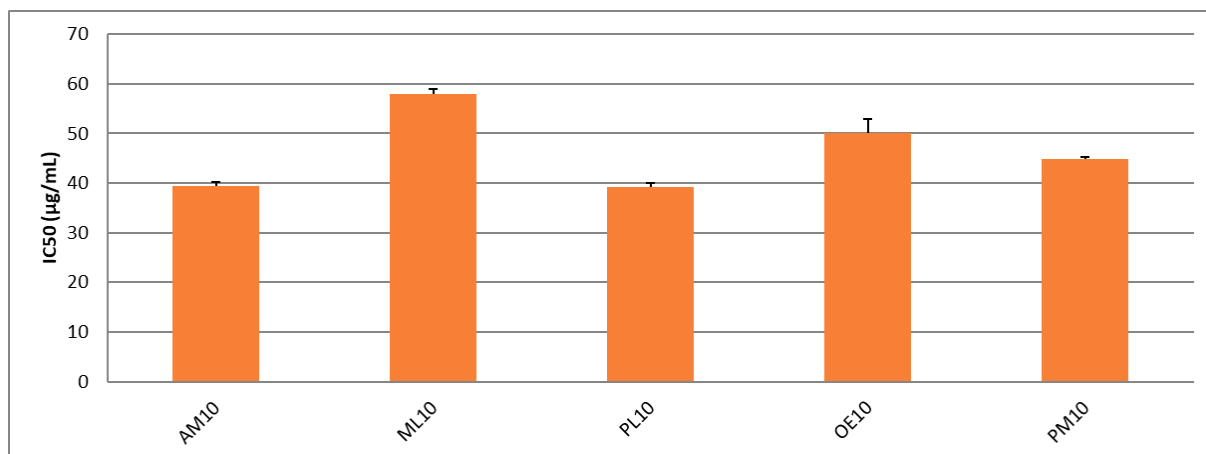
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. β -karoten linoleatna analiza

Analiza antioksidativne aktivnosti pomoću β -karotena i linoleinske kiseline temelji se na toplinom induciranoj oksidativnoj razgradnji β -karotena i linoleinske kiseline. Dolazi do nastajanja pentadienil slobodnog radikala odcjepljenjem vodika iz aktivne bis-alicil metilenske skupine između dvije dvostruke veze na C-11 linoleinske kiseline. Nastali aktivni radikal napada visoko nezasićene molekule β -karotena koje tako gube svoje konjugirane dvostruke veze, a time i specifičnu narančastu boju (Amarowicz i sur., 2004).

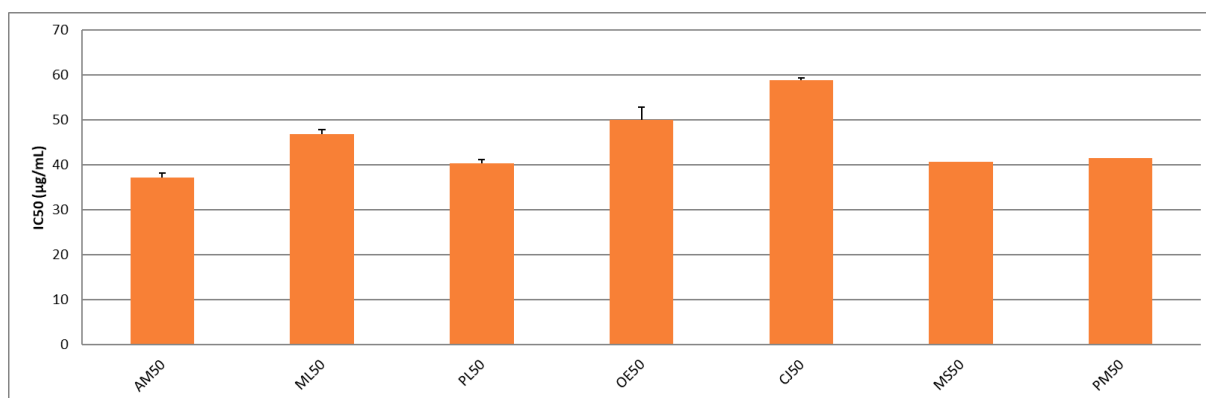
Fenolni i drugi antioksidansi mogu neutralizirati stvoreni slobodni radikal donirajući im svoj atom vodika, u ovom ispitivanju linoleatni slobodni radikali, te posljedično odgoditi obezbojenje emulzije. Izbjeljivanje β -karotena može se pratiti spektrofotometrijski na 459 nm što služi kao mjera antioksidativne aktivnosti. Što je narančasta boja postojanija, antioksidativna aktivnost je jače izražena (Amarowicz i sur., 2004).

Rezultati određivanja antioksidativne vrijednosti prikazani su na slikama 9., 10. i 11. kao IC_{50} vrijednost. Iz Slika 9., 10. i 11. možemo primijetiti da različita koncentracija otapala za ekstrakciju ne utječe značajno na antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti su pokazali relativno sličnu sposobnost inhibicije degradacije β -karotena.



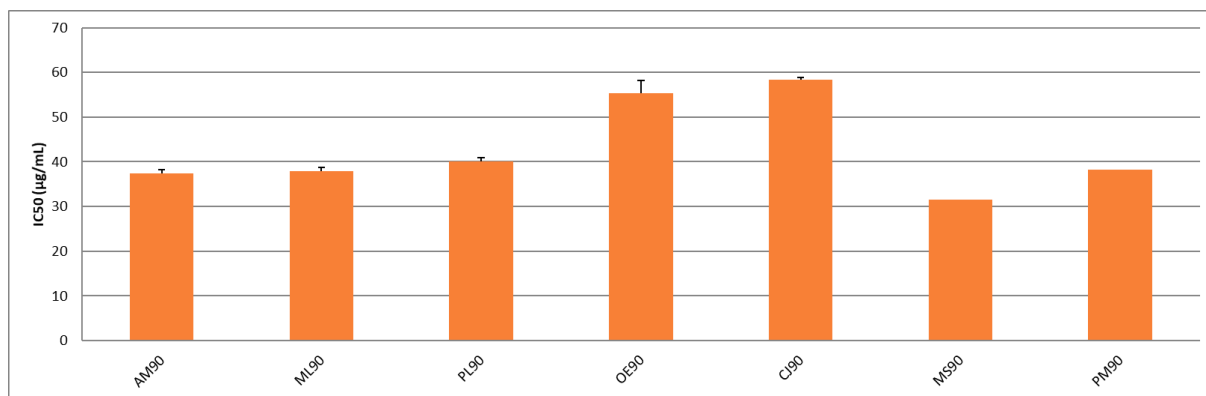
Slika 9. Antioksidativna aktivnost ekstrakata priređenih pomoću 10%-tnog etanola.

Najbolju antioksidativnu aktivnost ekstrakcijom s 10%-tnim etanolom pokazali su ekstrakti AM10 i PL10 (Slika 9.). Prilikom ekstrakcije s 50%-tnim etanolom ponovno su se kao najbolji pokazali ekstrakti AM50 i PL50, a podjednaku aktivnost imaju i MS50 i PM50 (Slika 10.).



Slika 10. Antioksidativna aktivnost ekstrakata priređenih pomoću 50%-tnog etanola.

Ekstrakti napravljeni pomoću 90%-tnog etanola pokazali su najveću učinkovitost, a kao najbolji se pokazao ekstrakt MS90 (Slika 11.) što se slaže s rezultatima iz literaturnog rada (Al-Dosari, 2012) gdje je pokazano da lucerna ima umjeren antioksidativni učinak. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da antioksidativna aktivnost odabranih biljnih vrsta raste s udjelom etanola u ekstrakcijskom otapalu, izuzev ekstrakta OE.



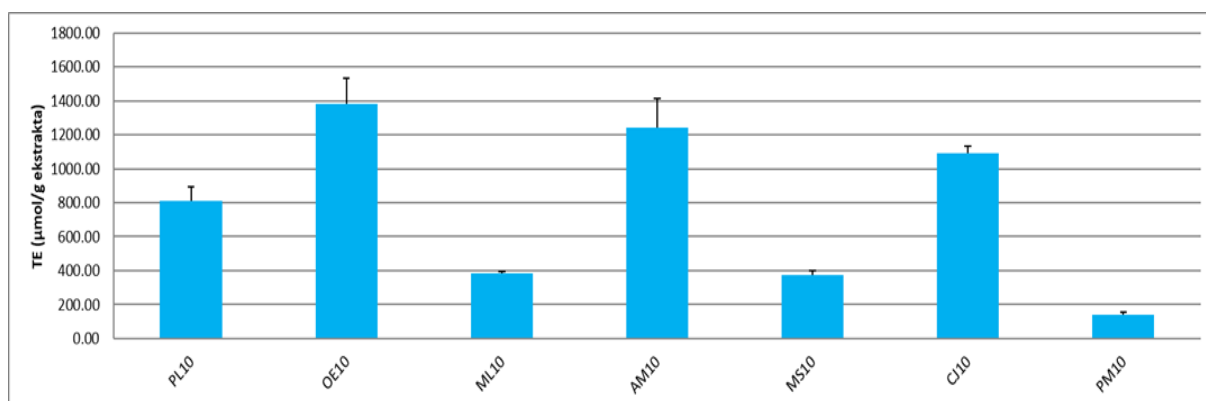
Slika 11. Antioksidativna aktivnost ekstrakata priređenih pomoću 90%-tnog etanola.

4.2. Ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala

Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) je metoda kojom se određuje antioksidativni kapacitet uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroksil radikala na fluorescentni spoj fluorescein. Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa i uzrokuje nastanak više slobodnih radikala koji dovode do oštećenja stanica. U ispitivanju slobodni peroksil radikal nastaje raspadanjem, azo spoja, 2,2-azobis-2-metilpropionamid-dihidroklorida (AAPH) pri 37 °C. On reagira s fluoresceinom pri čemu nastaje nefluorescentni produkt, a to uzrokuje pad fluorescencije što se može kvantificirati spektrofotometrijom. U nedostatku inhibitora nastali slobodni radikal će brzo „ugasiti“ fluorescenciju ispitivane otopine (Rafiq i sur., 2012; Gillespie i sur., 2007; Sies, 1997).

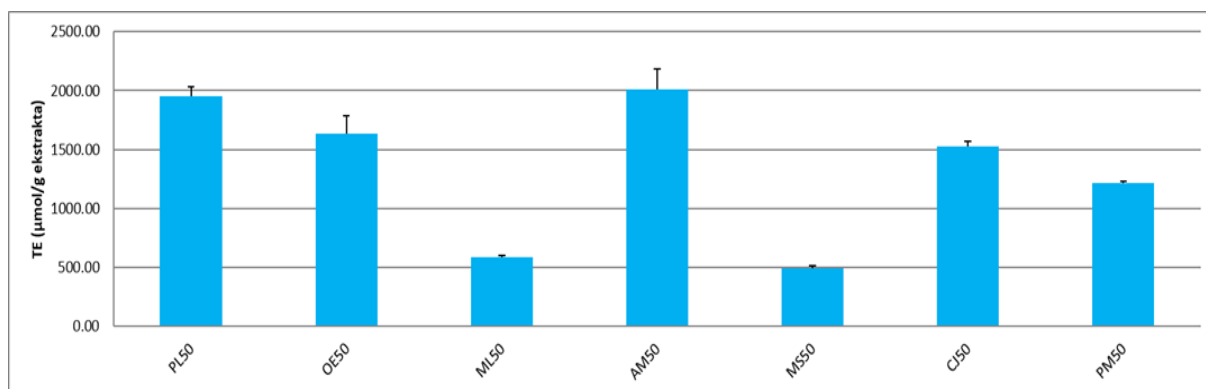
Metoda se zasniva na sposobnosti antioksidansa da neutralizira aktivnost peroksilnog radikala donirajući mu proton. Kao pozitivna kontrola koristi se Trolox koji je sintetski antioksidans, analog vitamina E. ORAC metodom se najčešće mjere antioksidativna svojstva fenolnih spojeva i ona su bolja što je ORAC vrijednost veća (Rafiq i sur., 2012; Gillespie i sur., 2007).

Rezultati određivanja antioksidativne vrijednosti ORAC metodom prikazani su na slikama 12., 13. i 14. Aktivnost je izražena u Trolox ekvivalentima (TE). Prilikom mjerenja antioksidativne vrijednosti ekstraktima priređenima pomoću 10%-tnog etanola kao najbolji pokazao se PM10. Ekstrakti ML10 i MS10 imaju podjednak, ali nešto slabiji antioksidativni kapacitet, dok su ostali ekstrakti značajno lošiji kao antioksidansi.



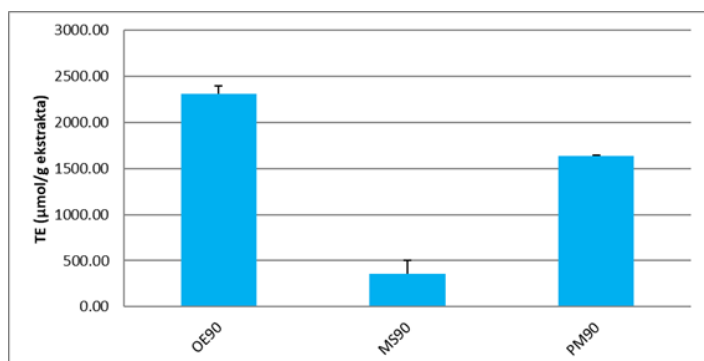
Slika 12. Antioksidativna vrijednost ekstrakata priređenih pomoću 10%-tnog etanola određena ORAC metodom

Promjenom ekstrakcijskog otapala u 50%-tni etanol, najveću antioksidativnu vrijednost pokazali su ekstrakti ML50 i MS50. Svim ostalim ekstraktima antioksidativni kapacitet se smanjio u odnosu na ekstrakte pripremljene s 10%-tnim etanolom. Ekstraktu PM aktivnost je značajno pala promjenom otapala.



Slika 13. Antioksidativna vrijednost ekstrakata priređenih pomoću 50%-tnog etanola određena ORAC metodom

Između ekstrakata izrađenih pomoću 90%-tnog etanola kao najbolji ponovno se pokazao MS90. Možemo zaključiti da ekstraktu MS promjena koncentracije ekstrakcijskog otapala ne utječe značajno na antioksidativnu aktivnost jer je u svim ispitivanjima imao najmanju vrijednost TE. U literaturnom radu (Ferreira i sur., 2015) ORAC metodom pokazano je da lucerna ima antioksidativnu aktivnost u rasponu od 244 do 287 μmol/g što se podudara s uzorkom MS90 koji ima 356 μg/mL. Također se može vidjeti da svim ostalim ekstraktima antioksidativni kapacitet pada s porastom koncentracije etanola u otapalu.

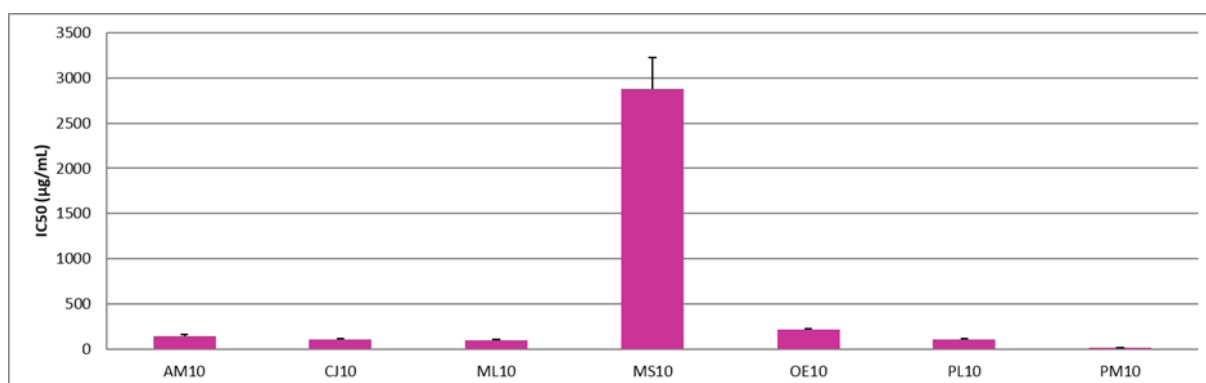


Slika 14. Antioksidativna vrijednost ekstrakata priređenih pomoću 90%-tnog etanola određena ORAC metodom

4.3. Analiza inhibicije enzima kolagenaze

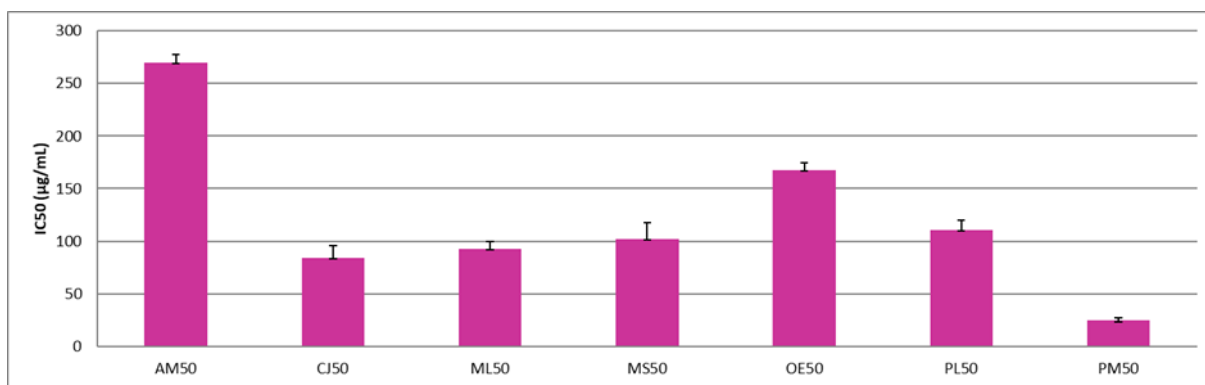
Analiza aktivnosti kolagenaze i inhibitornog učinka biljnih ekstrakata na kolagenazu spektrofotometrijom temelji se na reakciji ninhidrinskog reagensa s aminima. Amini se nalaze u aminokiselinama, na N-terminalnom kraju proteina i na bočnim lancima aminokiselina lizin i arginin. U ispitivanju je kao supstrat za kolagenazu korištena otopina želatine. Hidroliza želatine potaknuta je kolagenazom i inkubacijom pri 37 °C. Aminokiseline i peptidi nastali hidrolizom želatine tvore kompleks s ninhidrinom koji je karakteristične ljubičaste boje i može se detektirati spektrofotometrijski na valnoj duljini od 545 nm (Zhang i sur., 2013).

Inhibicijom kolagenaze sprječava se hidroliza želatine na manje fragmente. U tom slučaju ninhidrin nema supstrat za reakciju i ne dolazi do obojenja ispitivane otopine. Što je ljubičasta boja otopine slabijeg intenziteta to je kolagenaza jače inhibirana ekstraktima odabranih biljnih vrsta.



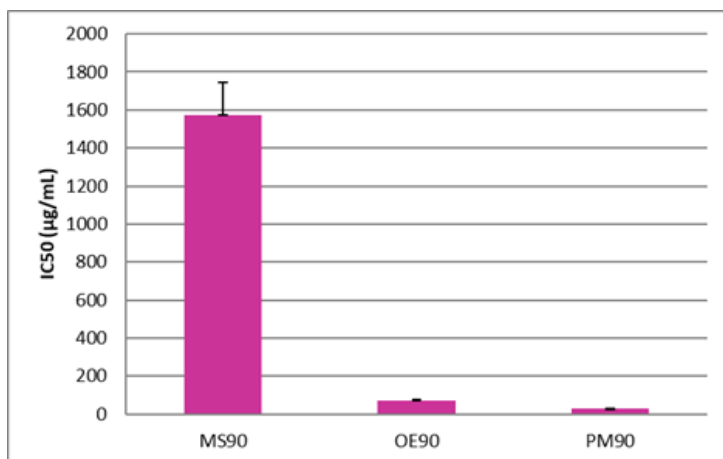
Slika 15. Inhibicija kolagenaze ekstraktima priređenim pomoću 10%-tnog etanola.

Rezultati određivanja inhibicije kolagenaze prikazani su na slikama 15., 16. i 17 kao IC₅₀ vrijednost, odnosno koncentracija koja izaziva inhibiciju 50 % kolagenaze. Dakle što je IC₅₀ vrijednost manja, ekstrakt je bolji inhibitor kolagenaze. Možemo primijetiti da različita koncentracija otapala za ekstrakciju značajno utječe na inhibiciju kolagenaze. Prilikom ekstrakcije s 10%-tnim etanolom kao najbolji se pokazao ekstrakt PM10, dok je najmanju inhibitornu aktivnost imao ekstrakt MS10 (Slika 15.). Otopine ostalih ekstrakata također su se pokazale kao relativno dobri inhibitori kolagenaze.



Slika 16. Inhibicija kolagenaze ekstraktima priređenim pomoću 50%-tnog etanola.

U ispitivanju ekstrakata pripremljenih pomoću 50%-tne otopine etanola kao najjači inhibitor kolagenaze možemo ponovno izdvojiti ekstrakt PM50 (Slika 16.), premda pokazuje jaču inhibitornu aktivnost prilikom ekstrakcije s 10%-tnim etanolom. Ekstraktu AM50 u odnosu na AM10 dvostruko se smanjila sposobnost inhibicije kolagenaze. U odnosu na ekstrakt priređen s 10%-tnim etanolom MS50 pokazao je znatno bolju inhibitornu aktivnost.



Slika 17. Inhibicija kolagenaze ekstraktima priređenim pomoću 90%-tnog etanola.

Usporedbom sva tri načina ekstrakcije možemo primijetiti da ekstrakt MS najveću učinkovitost ima ekstrakcijom u 50%-tnom etanolu, dok ekstraktu OE učinkovitost raste s

koncentracijom etanola u ekstrakcijskom otapalu. Kao najučinkovitiji u inhibiranju kolagenaze pokazao se ekstrakt PM neovisno o koncentraciji etanolnog otapala za ekstrakciju. Međutim najveća učinkovitost se postiže ekstrakcijom s 10%-tnim etanolom. Nisu pronađeni odgovarajući literaturni podaci s kojima bi se rezultati mogli usporediti, ali je u literaturnom radu (Ashkani-Esfahani i sur., 2018) pokazano da *Plantago major* potiče sintezu kolagenskih vlakana, proliferaciju fibroblasta i revaskularizaciju prilikom ozljede kože.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost pomoću ORAC i β -karoten linoleatne metode te ispitati sposobnosti inhibicije kolagenaze odabranih biljnih vrsta. Uspoređivani su etanolni ekstrakti različitih koncentracija (10%, 50% i 90%) od ukupno sedam biljnih vrsta te su doneseni sljedeći zaključci.

β -karoten linoleatnom analizom zaključili smo da svih sedam biljnih vrsta ima dobar antioksidativni potencijal, a najveći potencijal je pokazala biljna vrsta *Medicago sativa* L., Fabaceae. Antioksidativni potencijal ispitivanih ekstrakata raste s koncentracijom etanola u ekstrakcijskom otapalu. Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti ORAC metodom kao najučinkovitije istaknule su se biljne vrste porodice Fabaceae, *M. lupulina* i *M. sativa* i porodice Plantaginaceae, *P. major* L. Kao najučinkovitiji način pripreme ekstrakata pokazala se ekstrakcija s 10%-tnim etanolom. Za inhibiciju kolagenaze najviše potencijala primijetili smo kod biljne vrste *P. major* koja je ekstrakcijom sa sve tri vrste otapala pokazala najveću učinkovitost. Iz svega navedenog možemo zaključiti da svih sedam biljaka ima dobar potencijal za primjenu kao sastavnica topikalnih pripravaka za njegu kože.

6. LITERATURA

1. *Achillea millefolium* L., Thomé OW. Flora von Deutschland. Gera, Österreich und der Schweiz, 1885.
2. Al-Dosari MS. In Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) on Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 40, No. 4, 2012, 779-793.
3. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 2004, 84, 551-562.
4. Ashkani-Esfahani S, Khoshneviszadeh M, Noorafshan A, Miri R, Rafiee S, Hemyari K, Kardeh S, Koochi Hosseinabadi O, Fani D, Faridi E. The Healing Effect of *Plantago Major* and *Aloe Vera* Mixture in Excisional Full Thickness Skin Wounds: Stereological Study. *World J Plast Surg.*, 2019 (1):51-57.
5. Ašič S. Ljekovito bilje. Rijeka, Dušević i Kršovnik, 1995, str. 126-127.
6. Baloch N, Nabi S, Al-Kahraman YMSA. In vitro Antimicrobial, Insecticidal, Antitumor Activities and Their Phytochemical Estimation of Methanolic Extract and its Fractions of *Medicago lupulina* Leaves. *World Applied Sciences Journal* 23 (4), 2013, 500-506.
7. Biswajit B, Hiranjit C, Pramod T, Suman K. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 173, 2017, 686–695.
8. Bora KS, Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review, 2011., *Pharmaceutical Biology* 49:2, 211-220.
9. Burda S, Jurzysta M. Isolation and identification of flavonoids from *Medicago lupulina* L. flowers. Department of Biochemistry and Physiology of Crop Plants, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Poland, 1988.
10. *Centaurea jacea* L., Thomé OW. Flora von Deutschland. Gera, Österreich und der Schweiz, 1885.
11. Ferreira JFS, Cornacchione MV, Liu Xuan, Suarez DL. Nutrient Composition, Forage Parameters, and Antioxidant Capacity of Alfalfa (*Medicago sativa*, L.) in Response to Saline Irrigation Water. *Agriculture* 2015, 5(3), 577-597.

12. Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia* 83, 2012, 921–925.
13. Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth EA. Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature protocols*, 2007, 4, 867-870.
14. Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 205-206.
15. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.*, 2007, 35(Pt 5):1147-50.
16. Kicel A, Olszewska MA. Evaluation of Antioxidant Activity, and Quantitative Estimation of Flavonoids, Saponins and Phenols in Crude Extract and Dry Fractions of *Medicago lupulina* Aerial Parts. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Poland, 2014.
17. Kremer B. Ljekovito bilje. Zagreb, Begen 2007, str. 187.
18. Kuštrak D. Farmakognozija-Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005, str. 140-143; 192-195; 341-343.
19. Lakušić R, Mišić Lj. Livadske biljke. Sarajevo, IP Svjetlost, 1990, str. 115.
20. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–772.
21. Marković S. Fitoaromaterapija. Zagreb, Centar-Cedrus, 2005, str. 357-359; 397-398
22. *Medicago lupulina* L., https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina, pristupljeno 10.10.2019.
23. *Medicago sativa* L., <https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa>, pristupljeno 10.10.2019.
24. *Olea europaea* L., Thomé OW. Flora von Deutschland. Gera, Österreich und der Schweiz, 1885.
25. Oleuropein, <https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein>, pristupljeno 10.10.2019.
26. *Plantago lanceolata* L., https://hr.wikipedia.org/wiki/Uskolisni_trputac, pristupljeno 10.10.2019.
27. *Plantago major* L., Thomé OW. Flora von Deutschland. Gera, Österreich und der Schweiz, 1885.
28. Rafiq M, Azeemuddin M, Anturlikar SD, Viswanatha GL, Patki PS. Application of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay in the estimation of antioxidant value of botanicals. *Oxid Antioxid Med Sci* 2012, 1(2):87-90.

29. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 2014.
30. Rosler H, Star AE, Mabry TJ. New 6-methoxyflavonols from *Centaurea jacea*. *Phytochemistry*, 1971, 450-451.
31. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.*, 1997, 82(2):291-5.
32. The Plant List, <http://www.theplantlist.org/>, pristupljeno 10.10.2019.
33. Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med.*, 2009, 9: 27.
34. Toplak Galle K. Hrvatsko ljekovito bilje. Zagreb, Mozaik knjiga 2001, str. 186-187.
35. Zhang Y, Fu Y, Zhou S, Kang L, Li C. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. *Analytical Biochemistry*, 2013, 437, 46-48.
36. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging. The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. 2018 May; 27(5): 729–738.
37. Zovko Končić M. Droge s iridoidima. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet, 2014.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1. Sažetak

Biljne vrste intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih i poznatih korisnih učinaka na kožu topikalnom primjenom. U ovom diplomskom radu ispitani su listovi biljne vrste *Olea europaea* te zeleni biljni vrsta *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* i *Centaurea jacea*. Uspoređivani su etanolni ekstrakti različitih koncentracija (10%, 50% i 90%). Cilj je bio utvrditi njihovu sposobnost inhibicije kolagenaze i odrediti njihovu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitana je β -karoten linoleatnom analizom i ORAC metodom, dok je inhibicija kolagenaze ekstraktima ispitana pomoću ninhidrinskog reagensa. Ispitivanja su pokazala da svih sedam biljnih vrsta ima dobar antioksidativni potencijal. Kao najučinkovitije možemo izdvojiti biljne vrste *M. sativa* i *M. lupulina*, Fabaceae i *P. major*. Utvrđeno je da ekstrakti pripremljeni s 10% i 90%-tnim etanolom imaju bolju učinkovitost od onih pripremljenih s 50%-tnim etanolom. Nadalje ispitivanja su pokazala da najveći potencijal za inhibiranje kolagenaze ima biljna vrsta *P. major*. Najbolja inhibicija kolagenaze je utvrđena kod ekstrakta pripremljenog s 10%-tnim etanolom.

7.2. Summary

Plants have been extensively researched for its numerous and well-known beneficial effects on topical skin application. This thesis examined the leaves of the plant species *Olea europaea* and aerial parts of *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* and *Centaurea jacea*. Ethanol extracts of different concentrations (10%, 50% and 90%) were compared. The aim was to determine their collagenase inhibition potential and to determine their antioxidant activity. The antioxidant activity of the extracts was tested by using β -carotene linoleic acid assay and ORAC method, while the inhibition of collagenase was tested by using ninhydrin reagent. The results have shown that all of these seven plant species have a good antioxidant potential. The most efficient were *M. sativa* and *M. lupulina* as well as *P. major*. We have also found that the extracts prepared using 10% and 90% ethanol were more efficient in the applied assays than those prepared using 50% ethanol. Furthermore, the results have shown that the best collagenase inhibition potential has a plant species *P. major*. Also the most efficient inhibition of collagenase was found in extracts prepared using 10% ethanol.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE INHIBICIJE KOLAGENAZE I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI ODABRANIH BILJNIH VRSTA

Marina Vujnović

SAŽETAK

Biljne vrste intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih i poznatih korisnih učinaka na kožu topikalnom primjenom. U ovom diplomskom radu ispitani su listovi biljne vrste *Olea europaea* te zeleni biljnih vrsta *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* i *Centaurea jacea*. Uspoređivani su etanolni ekstrakti različitih koncentracija (10%, 50% i 90%). Cilj je bio utvrditi njihovu sposobnost inhibicije kolagenaze i odrediti njihovu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitana je β -karoten linoleatnom analizom i ORAC metodom, dok je inhibicija kolagenaze ekstraktima ispitana pomoću ninhidrinskog reagensa. Ispitivanja su pokazala da svih sedam biljnih vrsta ima dobar antioksidativni potencijal. Kao najučinkovitije možemo izdvojiti biljne vrste *M. sativa* i *M. lupulina* i *P. major*. Utvrđeno je da ekstrakti pripremljeni s 10% i 90%-tnim etanolom imaju bolju učinkovitost od onih pripremljenih s 50%-tnim etanolom. Nadalje ispitivanja su pokazala da najveći potencijal za inhibiranje kolagenaze ima biljna vrsta *P. major*. Najbolja inhibicija kolagenaze je utvrđena kod ekstrakta pripremljenog s 10%-tnim etanolom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 17 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Maslina, Lucerna, Hmeljasta vija, Stolisnik, Uskolisni trputac, Veliki trputac, Livadna zečina, Kolagenaza, Antioksidativna aktivnost

Mentor: **Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Lovorka Vujić docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: Studeni 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EXAMINATION OF COLLAGENASE INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELECTED PLANT SPECIES

Marina Vujnović

SUMMARY

Plants have been extensively researched for its numerous and well-known beneficial effects on topical skin application. This thesis examined the leaves of the plant species *Olea europaea* and aerial parts of *Medicago sativa*, *Medicago lupulina*, *Achillea millefolium*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major* and *Centaurea jacea*. Ethanol extracts of different concentrations (10%, 50% and 90%) were compared. The aim was to determine their collagenase inhibition potential and to determine their antioxidant activity. The antioxidant activity of the extracts was tested by using β -carotene linoleic acid assay and ORAC method, while the inhibition of collagenase was tested by using ninhydrin reagent. The results have shown that all of these seven plant species have a good antioxidant potential. The most efficient were *M. sativa* L. and *M. lupulina* L., Fabaceae, as well as *P. major* L., Plantaginaceae. We have also found that the extracts prepared using 10% and 90% ethanol were more efficient in the applied assays than those prepared using 50% ethanol. Furthermore, the results have shown that the best collagenase inhibition potential has a plant species *P. major* L., Plantaginaceae. Also the most efficient inhibition of collagenase was found in extracts prepared using 10% ethanol.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 17 figures, 1 table and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive, Alfalfa, Black medic, Yarrow, Ribwort plantain, Broadleaf plantain, Brown knapweed, Collagenase, Antioxidant activity

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Bival Štefan Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2019.